

- (54) **PREPARATION OF MICROBIAL PROTEIN AND FAT AND OIL FROM VEGETABLE CARBOHYDRATE**  
 (11) Kokai No. 52-79084 (43) 7.2.1977 (21) Appl. No. 50-154368  
 (22) 12.24.1975  
 (71) MITSUI ZOSEN K.K. (72) MICHIIHIKO NOJIRI (4)  
 (52) JPC: 36(2)D72;D7;B02  
 (51) Int. Cl<sup>2</sup>. C12D13/06,13/08,C12B1/00

PCT second  
reference

**PURPOSE:** A method to obtain the fungus of high protein, and fat and oil content in high yield by liquifying starch with enzyme in a separated process and subsequently saccharifying and cultivating the liquid with enzyme simultaneously in one fermentation tank.

**CONSTITUTION:** The formulated starch raw material is continuously liquified in the presence of definite amount of  $\alpha$ -amylase by the instantaneous heating liquifaction process at 80–90°C. The produced liquid is filtered and diluted with water to the total sugar concentration of 1–8%, and a necessary amount of inorganic nutrient salts are added thereto affording a medium of pH4.5–7. The medium is sterilized, and continuously transferred into the fermentation tank, where enzymes (*Candida utilis*), bacteria, or other microbials are cultivated with continuous addition of definite amount of glucoamylase. By this process, the liquid is saccharified, and at the same time, the microbials are effectively grown taking the produced glucose or maltose as the basic carbon source. The saccharification completes in a short time without using a specially designed saccharification reactor.

- (54) **PREPARATION OF ANTIBIOTIC VALIDAMYCIN A**  
 (11) Kokai No. 52-79085 (43) 7.2.1977 (21) Appl. No. 50-154009  
 (22) 12.25.1975  
 (71) NIPPON SODA K.K. (72) SHUNICHI HAGIWARA (1)  
 (52) JPC: 36(2)D914  
 (51) Int. Cl<sup>2</sup>. C12D9/14

**PURPOSE:** Method for preparing an antibiotic validamycin A by a novel fungus belonging to *Streptomyces*.

**CONSTITUTION:** *Streptomyces prasinus* LD-473(Bikoken deposit No. 3352) is aerobically cultivated in a conventional medium, and validamycin A is separated from the medium by conventional technique for the separation of water-soluble antibiotics.

- (54) **PREPARATION OF ANTIBIOTIC TUNICAMYCIN**  
 (11) Kokai No. 52-79086 (43) 7.2.1977 (21) Appl. No. 50-154010  
 (22) 12.25.1975  
 (71) NIPPON SODA K.K. (72) SHUNICHI HAGIWARA (2)  
 (52) JPC: 36(2)D914  
 (51) Int. Cl<sup>2</sup>. C12D9/14

**PURPOSE:** A method for the preparation of an antibiotic tunicamycin by a novel fungus belonging to *Streptomyces*.

**CONSTITUTION:** *Streptomyces*-SP-LA-507 (Bikoken deposit No. 3353) is aerobically cultivated in a conventional medium, and tunicamycin is separated from the medium by conventional separation technique for the separation of oil-soluble antibiotics. The in vitro anti-fungus activities of the antibiotic to various fungi of plant diseases are shown in the table.

a. fungus b. diameter of inhibition zone

a	b
<i>Corynebacterium michiganense</i>	—
<i>Erwinia amylovora</i>	—
<i>Pseudomonas tabaci</i> 6602	—
<i>Xanthomonas citri</i> E-QK-6507	—
<i>Botrytis cinerea</i> M-7	16
<i>Fusarium oxysporum</i>	—
<i>Glomerella singulata</i> M-69-2	12
<i>Puccinia sasakii</i>	13
<i>Penicillium digitatum</i> AHU 8004	—
<i>Puccinia oryzae</i> P-2	18

⑨日本国特許庁  
公開特許公報

⑩特許出願公開  
昭52—79084

⑪Int. Cl. <sup>2</sup> C 12 D 13/06 C 12 B 1/00 C 12 D 13/08	識別記号 1 0 1	⑫日本分類 36(2) D 72 36(2) D 7 36(2) B 02	庁内整理番号 7349—49 7349—49 7235—49	⑬公開 昭和52年(1977)7月2日 発明の数 1 審査請求 未請求
---	---------------	--	---	---

(全 4 頁)

⑭植物系炭水化物を用いる微生物蛋白及び油脂  
の製造法

⑮特 願 昭50—154368  
⑯出 願 昭50(1975)12月24日  
⑰発 明 者 野尻導彦  
高石市綾園3—1—8  
同 角谷和生  
西宮市花園町9番27号  
同 上殿茂三

大阪市淀川区木川東1—5—23  
⑱発 明 者 上中居和男  
堺市西永山園2—19  
同 松本正文  
大阪市住ノ江区柴谷1—1—57  
⑲出 願 人 三井造船株式会社  
東京都中央区築地5丁目6番4  
号  
⑳代 理 人 弁理士 梶谷昇次

明 細 書

1. 発明の名称

植物系炭水化物を用いる微生物  
蛋白及び油脂の製造法

2. 特許請求の範囲

植物系炭水化物、澱粉質を原料として微生物を培養して菌体蛋白を製造する方法において、原料澱粉質を液化反応器内で液化型酵素を用いて液化を行い液化工程と生成した液化液を醗酵槽内で糖化型酵素を無菌的に添加して糖化反応を行わせながら微生物を培養する糖化培養工程を有することを特徴とする微生物蛋白及び油脂の製造法

3. 発明の詳細な説明

植物系炭水化物、澱粉質を醗酵生産又は菌体蛋白(S.C.P)及び油脂生産の原料として用いる際使用する微生物菌株が単糖又はオリゴ糖しか利用できない場合は適当な手段で前もって加水分解(糖化)しておく必要がある。

この点に関して従来より行われている方法としては澱粉質からのアルコール生産におけるアミロ

法、糖法あるいはアミロ糖折衷法等が代表的なものである。これらの方法はいずれも主醗酵の前段階として醗菌を好適な条件のもとに数十時間かけて生育させ、その産生するアミラーゼによつて糖化を行っている。そしてその培養管理、操作も複雑で長時間を要する。したがつてS.C.P生産を目的とする場合のように短時間に大量の原料を簡単な方法で処理することが要求されるプロセスには適さない。

また最近澱粉廃液からのS.C.P生産法として注目されているものにシンバ(Symba)プロセスがあるが、これは前醗酵槽においてアミラーゼ生産能を持つ特殊な微生物(Endomycopsis fibilgar)を熱殺菌後の澱粉に作用させ糖化を進めておき、次に主醗酵槽に送つてカンジダユティリス(Candida utilis)を主イースト(main yeast)として培養する混合培養(共生)法である。

しかしながらシンバプロセスにおいては原料澱粉濃度が高くなると熱殺菌時において糖化現象が現われることが考えられ、その仕込濃度に限界が

生じるものと推定される。また主醱酵が二種類のイーストの混合培養であるため、その生育バランスが問題となり、培養管理のむずかしさや品質の安定性維持なども容易ではない。

本発明は澱粉質原料から  $\text{S.C.P}$  及び油脂を製造するにあつて、原料→酵素液化工程→培地調製→酵素糖化培養工程→菌体分離濃縮工程→乾燥工程→製品 ( $\text{S.C.P}$ ) と言う工程をとり、本発明プロセスは特に酵素液化工程と酵素糖化培養工程を有することを大きな特徴としている。

澱粉質原料を  $\text{S.C.P}$  製造に用いる場合、使用菌株自体がアミラーゼ活性を有する以外は澱粉を予め加水分解する必要がある。本プロセスでは加水分解の問題をまず第1段階として液化工程において市販の精製液化酵素を用いて短時間に連続的に液化し、次にその液化液に無機栄養塩類等を加え適当な培養濃度に調整後、第2段階としてこれを熱殺菌して醱酵槽に送り微生物の培養に供するが、この時市販の糖化型アミラーゼを無菌的に醱酵槽内に添加していき、液化液の糖化と同時に微

(3)

合成反応や酵素の生成物抑制が防げられるものと考えられる。実際澱粉液化液を糖化型酵素を所定量用いて糖化反応槽で  $\text{DE 97}$  以上の糖化率を得るには60~90時間を要するが、本発明プロセスの糖化培養工程では全糖濃度4%に調整した澱粉液化液培地でカンジダ属酵母は14~24時間で培養が終了しその場合の酵母収率は添加全糖量に対し45~52%であり残糖量も0.02~0.05%であつた。

本発明の一実施例を図面を参照して説明すると、第1図の方法は原料調整工程1→酵素液化工程2→培地調整3→滅菌工程4→酵素糖化培養工程5→菌体分離濃縮工程6→乾燥工程7→製品8の工程よりなる。

原料調整工程では多種多様な原料を使用することができることが本プロセスの特長の一つであるが、本工程は使用する原料の性質、形状によつて適当な処理を施し以下の工程に支障のないようにする工程である。

例えばキャッサバその他の生イモをそのまま原料とする場合は磨砕、篩分け、再磨砕等を施し均

(5)

生物の培養を行う。これが酵素糖化培養工程である。

本発明では液化工程を独立させることによつて、従来のアミラーゼ活性微生物を前培養する方法 (アミロ法、醱法、Symba法等) に比べ単純な化学反応操作として取り扱えるため、大量の原料を短時間に率効良く連続的に処理できること、運転管理、操作が簡単で自動化し易いこと、高濃度のものまで処理できる等の効果がある。これらの長所は特に  $\text{S.C.P}$  製造手段としては不可欠である。

また糖化と培養を同時に行うことによつて、単に糖化反応容器が省けるといだけでなく加水分解反応がより効率的に短時間に行われるという効果がある。即ち糖化のような加水分解反応は一般に可逆反応であり、また酵素を用いた場合は生成物抑制という現象が起ることはよく知られているが、糖化と培養を同時に行うことにより、糖化酵素によつて遊離されたグルコース又はマルトースは共存する微生物の基質となつて変換されることで速かに加水分解反応系外に除去されるため、遊

(4)

一なスラリーとし、澱粉濃度やpHの調整を行う。又澱粉工場廃液を原料とする場合にはpH調整、澱粉濃度調整の他必要に応じて除蛋白操作を行うこともある。

酵素液化工程では調整後の原料に所定量の液化型酵素 ( $\alpha$ -Amylase) を加え、酵素による液化反応を行う工程である。本工程は瞬間加熱液化法で、通常2段の連続液化槽で行われ、温度は80℃~92℃、滞留時間は30分~90分間である。

培地調整は液化後の原料は水を加えて全糖濃度を1~8%、通常4%に希釈した後、窒素、リン、マグネシウム、カリウム、その他の無機栄養塩類等を必要量添加し、pHを4.5~6として培地を調整するものである。滅菌工程では培地は120℃~135℃の高温加圧下、10~60分間で加熱滅菌され本工程は通常連続的に進行。

酵素糖化培養工程において、滅菌後の培地は醱酵槽へ送られ、酵母、バクテリア、その他の微生物の培養が行われる。この際同時に糖化型酵素 (Gluco-Amylase) を所定量無菌的に添加し培地

(6)

( 糖化液 ) の糖化反応を行うと同時に生成したグルコース又はマルターゼを基質炭素源として微生物が効率的に増殖する。糖化酵素の無菌的添加法として、例えば液状の糖化型酵素 (ex グルカザイム N 液—天野製薬) をボアサイズ 0.2  $\mu$  程度のマイクロフィルター (ex ミリボアフィルター—米国ミリボア社) を通して除菌して無菌化するとよい。本工程は pH 3.0 ~ 7.0、温度 30℃ ~ 45℃ で通気、攪拌の好氣的条件下で培養を行う。また本工程は回分式でも可能であるが連続培養がより効率的である。連続多段培養としては、例えば第 2 図に示すように通常三段の連続醗酵槽 11, 12, 13 を用いて行ない、第 3 槽 13 の容積は第 1 槽 11、第 2 槽 12 の 2 倍にする。増殖は管 15 により送られ、糖化酵素は管 16 より供給され、各槽は管 17 により順次連絡されている。又第 1 槽へは第 2 槽より培養液の一部を管 14 により返送し、この返送量は使用菌株の比増殖速度、各槽の有効容積、菌体濃度、送入培地濃度及び量等によつて決定されるようにする。

この培養液の一部返送の意味は第 1 槽へ第 2 槽

(7)

の分離機によつて行われる。

乾燥工程は濃縮された菌体スラリー又はケーキを乾燥して製品化する工程である。本工程は通常スプレードライヤーあるいはドラムドライヤー等が用いられるが、場合によつては特殊な乾燥機で粒状又はペレット状の乾燥製品とすることもある。

#### 実施例 1

熱帯産キヤツサバ根莖 (タビオカイモ) を磨砕し水を加えて澱粉含量を 16% にした後 pH 6.0 に調整し液化酵素 (スビターゼ K) を対澱粉当り 0.2% 添加する。このスラリーを液化工程で温度 80~90℃ のもとで連続的に液化する。液化液は除菌した後水を加えて全糖濃度 1.5 ~ 8% に希釈し無機栄養塩類を必要量加え pH 4.5 ~ 5 の培地を調整する。培地は滅菌器で連続的に加熱滅菌されて醗酵槽へ送られる。糖化培養工程は連続培養法で行い、糖化酵素を所定量連続的に無菌的に添加しつつ、使用菌株としては酵母 *Candida utilis* の培養を行う。遠心分離濃縮後乾燥を行い製品 B.C.P. を得た。この結果使用したタビオカイモ中の澱粉に対

(9)

特開昭52-79084 (3)

の増殖活性の高い菌体を補充することによつて、第 1 槽の菌体濃度の安定を保ち第 1 槽への培地送入口を大きくしてもいわゆるウォッシュアウト (Wash out) なる現象を起こしにくくするためである。多段連続培養で返送を行う場合は最終槽からのものが一般的であるが、本プロセスの場合第 2 槽の活性の高い対数増殖期 (logarithmic phase) の菌を返送するのが特色である。

したがつて本プロセスの三段連続培養系において、第 1 槽は菌体の活性上昇並びに糖化反応の進行、第 2 槽は菌の増殖活性が最大となる対数増殖期、第 3 槽ではいわゆる定常期 (Stationary phase) の状態であり、菌体の熟成と残糖の消化によつて醗酵液の B.C.D. その他の著しい減少がもたらされる。

菌体分離、濃縮工程は菌体の生育が完了した培養液を菌体と上澄液に分離し菌体を濃縮する工程である。必要に応じて濃縮菌体に水を加えて洗浄後再び濃縮する。本工程は通常ノズル型の遠心分離機又は菌種によつてはデカンターその他のタイプ

(8)

し 45 ~ 53% の収率で乾燥菌体を得られた。

#### 実施例 2

ジャガイモ澱粉工場廃液 (乾物含量約 8%、可溶性無窒素物 3 ~ 4%) を pH 6 に調整後、所定量の液化酵素を加えて液化する。必要無機塩類を添加して培地を調整後、加熱滅菌しながら連続的に醗酵槽へ送る。所定量の糖化酵素を無菌的に添加しながら *Candida* 属酵母の連続培養を行う。培養液中の酵母菌体の分離、濃縮、乾燥を行い、乾燥酵母菌体を得た。この場合可溶性無窒素物の推定約 45% が酵母菌体となつた。

#### 実施例 3

キヤツサバ生芋を実施例 1 と同様の操作で原料調整液化を行う。液化液の全糖濃度を 2 ~ 5% に希釈して無機塩類を加えるがこの際窒素源の C/N 比を 20 ~ 40 として培地を調整する。

この培地を滅菌工程を経て醗酵槽へ送る。同時に醗酵槽へ所定量の糖化型アミラーゼを無菌的に添加しつつ油脂生産の高い *Rhodotorula* 属酵母の培養を回分式又は連続式で行う。培養液を分離、

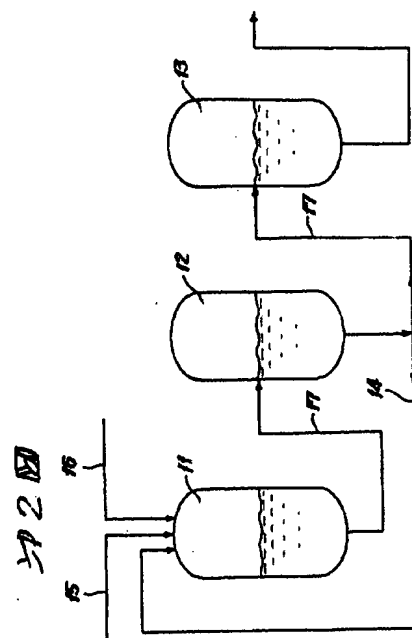
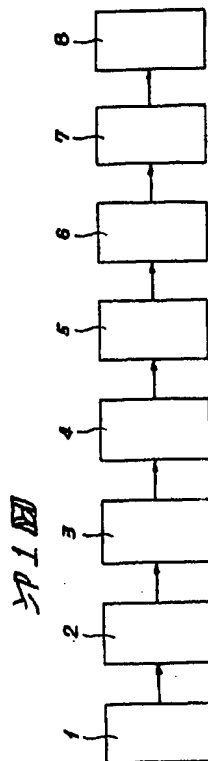
濃縮後乾燥し油脂含量の高い乾燥菌体が得られる。  
このようにして得られた乾燥菌体はキャッサバ生  
芋含有炭 に対し40～48%の収率であり、乾燥菌  
体中の油脂含量は15～50%にも達する。

また分離、濃縮後油脂抽出工程を別に設ければ  
植物油脂に成分組成のよく似た良質の油脂が得ら  
れる。さらに抽出残渣を乾燥すると高蛋白質含量の  
乾燥菌体製品が得られる。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明による工程を示す図、第2図は  
酵素糖化培養工程の一例を示す図である。

1…原料調製工程、 2…酵素液化工程、  
3…培地調製、 4…滅菌工程、 5…酵素糖化  
培養工程、 6…菌体分離濃縮工程、 7…乾燥  
工程、 8…製品、 11…第1槽、 12…第2槽、  
13…第3槽、 14…管、 15…管、 16…管、  
17…管。



出願人 三井造船株式会社

代理人 梶谷昇

01

#### 手続補正書

昭和 51 年 2 月 17 日

特許庁長官 片山石郎  
特許庁審査官



#### 7 補正の内容

- (1) 明細書第7頁2行「マルターゼ」を「マルトース」と訂正する。
- (2) 同第8頁3行～4行「Washaut」を「Washout」と訂正する。

#### 1 事件の表示

昭和 50 年特許願第 154368 号

2 発明の名称 植物系炭水化物を用いる微生物  
蛋白及び油脂の製造法

3 補正をする者 特許出願人

(590) 三井造船株式会社

4 代理人

東京都新宿区西新宿6丁目7-23  
ストークビルディング901号 〒160

(5712) 弁護士 梶谷昇

電話(03)343-3731番(代)

5 補正命令の日付 昭和 年 月 日 (自発)

6 正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄